



*Sveriges lantbruksuniversitet*

Fakulteten för Veterinärmedicin och husdjursvetenskap

Institutionen för Kliniska Vetenskaper

# Enzymaktivitet i blodet hos friska hundar och hundar med bakteriell livmoderinflammation

Camilla Axelsson

*Uppsala*

*2010*

*Examensarbete inom veterinärprogrammet*

*ISSN 1652-8697*

*Examensarbete 2010:94*

# Enzymaktivitet i blodet hos friska hundar och hundar med bakteriell livmoderinflammation

Camilla Axelsson

*Handledare: Ragnvi Hagman, Institutionen för Kliniska Vetenskaper  
Examinator: Bernt Jones, Institutionen för Kliniska Vetenskaper*

*Examensarbete inom veterinärprogrammet, Uppsala 2010  
Fakulteten för Veterinärmedicin och husdjursvetenskap  
Institutionen för Kliniska Vetenskaper  
Kurskod: EX0239, Nivå X, 30hp*

*Nyckelord: Pyometra, Sepsis, Mastceller, Proteaser*

*Online publication of this work: <http://epsilon.slu.se>  
ISSN 1652-8697  
Examensarbete 2010:94*

## INNEHÅLLSFÖRTECKNING

Sammanfattning .....	1
Summary.....	2
Inledning .....	3
Pyometra .....	3
Mastceller.....	6
Syfte.....	8
Metod och material.....	8
Etisk prövning .....	8
Djur.....	8
Blodprovstagning .....	8
Makroskopisk och histopatologisk undersökning .....	9
Western Blot .....	9
Mätning av enzymaktiviteten.....	11
Real time PCR.....	11
Direktmikroskopi.....	13
Statistik .....	14
Resultat .....	14
Mastin .....	14
Caspase 4 och Tryptas .....	15
Elastase-lik, Chymotrypsin-lik samt CPA-aktiviet .....	16
Trypsin-lik aktivitet .....	18
Direktmikroskopi av histologipreparat .....	18
Diskussion.....	19
Tack .....	22
Referenser .....	23



## **SAMMANFATTNING**

Pyometra, varbildande livmoderinflammation, är en vanlig sjukdom på okastrerade äldre tikar. Under efterlöpet, då livmodern är under påverkan av progesteron, skapas en gynnsam miljö för bakterier att växa till, vilket kan leda till att pyometra utvecklas. De vanligaste symptomen är nedsatt allmäntillstånd, nedsatt aptit, variga flytningar från könsvägarna, polyuri och polydipsi samt kräkningar. Behandlingen som rekommenderas är vanligen ovariohysterektomi.

Mastceller är celler som främst är kända för att spela en stor roll vid allergiska reaktioner, då de frisätter preformerade granula innehållande bl.a. histamin, serotonin och cytokiner vilket ger upphov till en immunmedierad överkänslighetsreaktion. Mastceller har även visats vara involverade i det medfödda försvaret mot vissa patogener. Mastceller har även granula innehållande proteaser. Proteaser är enzymer som klyver proteiner och det finns tre stycken mastcellsspecifika proteaser: chymaser, tryptaser och mastcells-CPA (carboxypeptidase A). Hos hund är det beskrivet att det finns ett chymas, ett tryptas samt mastin som är ett enzym med trypsinlik aktivitet.

Syftet med denna studie var att undersöka möjligt kliniskt värde av mastcellsenzymer som biomarkörer i blodet vid diagnos av samt eventuellt prognos för hundar med pyometra. I denna undersökning studerades nivåerna av enzymerna mastin, tryptas och caspase 4, men också elastas-lik aktivitet, CPA-aktivitet (carboxypeptidase A) samt chymotrypsin-lik aktivitet.

Med hjälp av real time PCR kunde en statistiskt signifikant skillnad ses i genuttrycket av mastin i livmodervävnaden hos hundar med pyometra jämfört med hos friska tikar. Dock kunde inte mätbara nivåer av varken mastin, tryptas eller caspase 4 i serum påvisas med hjälp av Western Blot. Någon skillnad i elastas-lik, chymotrypsin-lik eller CPA-aktivitet i serum mellan de båda grupperna kunde inte heller identifieras.

## SUMMARY

Pyometra, chronic purulent endometritis, is a common disease in intact older bitches. During metoestrus, when the uterus is influenced by the hormone progesterone, an environment favourable for bacterial growth is formed, which can lead to the development of the disease. The most common signs of pyometra are depression, anorexia, purulent vaginal discharges, polyuria, polydipsia and vomiting. The treatment of choice is ovariohysterectomy.

Mast cells are primarily known for their important roles in allergic reactions. When activated, mast cells release preformed granules containing for example histamine, serotonin and cytokines that generates an immune mediated hypersensitive reaction. Mast cells have also been shown to participate in the innate immunity defense against certain pathogens. Proteases, some of them produced by mast cells, are enzymes with the capacity to cleave proteins. There are three types of mast cell specific proteases: chymases, tryptases and mast cell CPA (carboxypeptidase A). Previously one chymase, one tryptase and mastin- an enzyme with trypsin-like activity have been demonstrated in dogs.

The purpose of this study was to examine possible bio markers, detectable in blood, for diagnosis of or possibly prognosis determination in dogs with pyometra. In this study we examined mastin, tryptase, caspase 4, elastase-like activity, CPA-activity (carboxypeptidase A) and chymotrypsin-like activity.

By means of real time-PCR a significant difference in the amount of mastin in uterine tissue between dogs with pyometra and healthy control dogs was detected. There were, however, no measurable concentrations in serum of mastin, tryptase or caspase 4 as examined with Western Blot. There was also no detectable difference between the two dog groups regarding protease activity (chymases-like, tryptases-like and CPA).

## INLEDNING

### Pyometra

Pyometra är en akut eller kronisk varbildande livmoderinflammation (Bild 1) som drabbar främst äldre tikar under efterlöpsperioden av löpcykeln. Sjukdomen orsakar både genitala och extragenitala förändringar och uppstår på grund av både hormonell påverkan och bakteriell infektion i livmodern. Under metöstrus (efterlöpsperioden) är blodkoncentrationen av hormonet progesteron hög och detta påverkar livmodern på olika sätt. Bland annat stimuleras körtelproliferation i endometriet och exkretionen från körtlarna ökar. Progesteron hämmar även immunförsvaret vilket gör livmodern mer mottaglig för bakterier. Aktiviteten av livmodermuskulaturen minskar och livmoderhalsen (cervix) hålls slutet. Allt detta tillsammans leder till en livmodermiljö som är lämplig för utveckling av foster men som även är lättare mottaglig för infektion med bakterier (Hardy et al., 1974). Exogent tillfört östrogen har inte visat sig kunna framkalla pyometra (Dow, 1959) men ökar däremot livmoderns mottaglighet för progesteronets effekter vilket kan vara anledningen till att behandling med östrogen för att avbryta dräktighet har associerats med ökad risk för pyometra (Bowen et al., 1985). Bakterier tar sig in i livmodern under östrus, då cervix är öppen och livmodern är under påverkan av östrogen. Kvarvarande bakterier kan sedan etablera en infektion under metöstrus under progesteronpåverkan (Hardy et al., 1974).

*Bild 1. Bilden visar en kraftigt förstorad och varfylld livmoder som avlägsnas med operationen ovariohysterektomi.*



Foto: Ragnvi Hagman

En vanlig patologisk förändring under metöstrus hos tikar är cystisk endometriehyperplasi (CEH), vilket länge har länge ansetts vara ett förstadie till pyometra (Hardy et al., 1974). Sannolikt uppstår CEH efter att livmodern vid upprepade tillfällen påverkats av progesteron och att detta i sin tur predisponerar livmodern för sekundär bakteriell påverkan vilket kan leda till pyometra (Dow, 1959). På senare tid har man dock börjat separera dessa två sjukdomstillstånd med avseende på klinisk bild och livmodermorfologi i två olika delar: CEH-mukometrakomplexet samt endometrit-pyometrakomplexet. De båda komplexen har mycket gemensamt, bland annat histologiskt, men anses kunna uppstå som två skilda lidanden (De Bosschere et al., 2000). Detta resonemang stöds av forskningsstudier som visar på skillnad i förekomst av östrogen- samt progesteronreceptorer vid de olika tillstånden (De Bosschere et al., 2002).

Den vanligaste bakterien som isoleras från livmodern hos hundar med pyometra är Gram-negativa bakterien *Escherichia coli* (*E. coli*). *E. coli* isolerades i 72 % av pyometrafallen i en forskningsstudie. I 16 % av fallen och näst vanligast i samma studie var en blandinfektion med *E. coli* och Gram-positiva streptokocker (Vandeplassche et al., 1991). Att *E. coli* vanligen isoleras kan förklaras både av att dessa bakterier hör till normala bakteriefloran i vagina hos tikar men också av att de har affinitet för epitel i både urinvägar och livmoder och även muskellager i urinvägarna. Affiniteten är beroende av livmoderns hormonella status och en progesteronpåverkad livmoder under metöstrus påverkar bakteriens bindningsförmåga positivt. På grund av *E. coli*-bakteriernas förmåga att binda till slemhinnan i livmodern kan de motstå de försvarsmekanismer som annars eliminerar bakterier från området (Sandholm et al., 1975).

Pyometra är en mycket vanlig sjukdom och har raspre disposition. Bland annat Rottweiler, Collie, Cavalier King Charles Spaniel och Golden Retriever har ökad risk att utveckla sjukdomen och även i tidig ålder. Av alla tikar yngre än 10 år som sökte veterinärvårdsersättning år 1996, och som var försäkrade i Agrias databas, fick 13,7 % diagnosen pyometra. Medelåldern för att utveckla sjukdomen var samma år 6.9 år, men detta är troligen lägre än den egentliga medelåldern då hundar över 10 år inte ingick i studien (Egenvall et al., 2001).

### **Symptom**

Allvarlighetsgraden på symptomen beror på om cervix är öppen eller sluten, sjukdomsdurationen samt hur allvarliga de extragenitala och uterina skadorna är. De vanligaste symptomen på pyometra är dock nedsatt allmäntillstånd, depression, anorexi, vaginala flytningar, poliuri/polydipsi samt kräkningar (Hardy et al., 1974).

Eftersom symptomen vid pyometra kan variera mycket finns många tänkbara differentialdiagnoser som till exempel dräktighet, diabetes, hyperadrenocorticism samt generell leversjukdom, vilka utesluts med adekvat diagnostik (Hardy et al., 1974).

### **Diagnostik och behandlingsprinciper**

Man bör alltid utesluta pyometra på en sjuk, okastrerad tik i efterlöpsperioden eftersom symptomen kan vara mycket varierande. En tik som uppvisar typiska



symptom som t.ex. vaginala flytningar, depression och kräkningar bör direkt undersökas och utredas vidare (Johnson C., 2003). Detta görs oftast genom att man tar blodprov för att undersöka blodbild och analysera biokemiska variabler. Hos hundar med pyometra kan man ofta se en höjning av ALP (alkaliskt fosfatas) i blodet samt ökad mängd vita blodkroppar och då främst en ökning av segmentkärninga neutrofiler (Wikström., 2008). Ofta undersöks också livmodern med röntgen alternativt ultraljud av buken för att utesluta dräktighet och påvisa vätska i livmodern. Dock kan det vara fördelaktigt att undersöka med ultraljud istället för med röntgen då en dräktig livmoder innan fostren kalcifierats ger en förstörad livmoder som annars kan vara svår att särskilja från den vid pyometra (Johnson C., 2003).

Man har vid pyometra visat att det sker förändringar av flera ytterligare inflammatoriska parametrar i blodet. Bland annat är nivåerna av prostaglandin  $F_{2\alpha}$ -metabolit 15-ketodihydro-PGF $_{2\alpha}$  (PG-metabolit) förhöjda och koncentrationerna var korrelerade med endotoxinnivåerna (Hagman et al., 2006). Det sker även en uppreglering av nästan 800 gener i livmodervävnaden vid pyometra. Dessa gener kodar bland annat för kemotaktiska proteiner, cytokiner, delar i komplementsystemet, proteoglykaner och proteaser som caspase 4 (Hagman et al., 2009). Caspase 4 är ett inflammatoriskt cysteinproteas vars funktion inte är helt klarlagd (Martinon et al., 2006). Då en okontrollerad aktivering av proteolys kan vara mycket skadlig för vävnaden är det viktigt att även inhibitorer uppregleras. Detta kunde också ses i livmodervävnad framförallt i form av SLPI, ett ämne som inhiberar proteaset neutrofilelastase (Hagman et al., 2009).

Den säkraste och mest effektiva behandlingen som rekommenderas vid pyometra hos tikar är kirurgiskt avlägsnande av livmoder och äggstockar (ovariohysterektomi). Det är viktigt att stabilisera tiken innan operation och bland annat ge intravenös vätsketerapi då tikarna ofta är uttorkade och har påverkat allmäntillstånd. En alternativ behandling finns i form av enbart medicinsk behandling men detta förutsätter en ung tik vid relativt god hälsa samt med öppen cervix (Johnson C., 2003).

Det kan dock vara riskabelt att inte operera vilket är anledningen till att tiken måste vara vid god hälsa om en enbart medicinsk behandling väljs. Koncentrationen fritt cirkulerande endotoxin i blodet har visat sig öka snabbt efter insättande av vissa sorters antibiotika vilket beror på lysis av både levande och döda bakterier. En frisk individ klarar av att oskadliggöra (detoxifiera) fritt endotoxin i blodet. Om stora mängder av fritt endotoxin kommer ut i blodbanorna, som vid bakteriell sepsis, kan den ökade endotoxinmängden leda till att leverns detoxifieringsförmåga och det reticuloendoteliala systemets kapacitet överskrids (Shenap et al., 1984). Hela 80 % av det reticuloendoteliala systemet, bl.a. den fagocytiska aktiviteten, finns i levern och kan skadas av cirkulerande endotoxiner. Detta resulterar i s.k. "spill over"-effekt, vilket innebär att bakterier och endotoxiner inte oskadliggörs av levern och därför kan orsaka inflammatoriska reaktioner och skada i flera organ i kroppen (Okano et al., 1993).

## **Prognos**

Prognosen för pyometra varierar kraftigt beroende på tikens allmäntillstånd och om generell inflammation eller blodförgiftning utvecklas. Man har visat att hundar med pyometra har högre koncentration av endotoxiner i blodet jämfört med friska hundar. Detta anses bero på absorption av endotoxiner från livmodern ut i blodet. De tikar med pyometra som hade sämst prognos hade i en studie även betydligt högre blodkoncentrationer av endotoxin jämfört med de hundar som hade lite bättre prognos och överlevde. Vissa hundar hade låga endotoxinnivåer trots sjukdomen och detta skulle kunna bero på att de hade en livmoderinflammation orsakad av Gram-positiva bakterier istället för Gram-negativa bakterier (Okano et al., 1998). Enligt samma studies författare kunde man inte heller se en lika kraftig ökning av endotoxinnivån hos hundar med öppen pyometra (opublicerade data, Okano et al., 1998). Endotoxiner försvinner i regel snabbt från blodbanorna, vilket gör att de kan vara svåråtkämpliga även om de redan hunnit initiera många inflammatoriska reaktioner. Endotoxiner binder också lätt till bland annat proteiner i blodet vilket gör att mätmetoden för endotoxin har flera praktiska svårigheter och möjliga felkällor. Eftersom nivåerna av PG-metabolit är korrelerade med nivån av endotoxiner och är relativt stabil och inte varierar lika snabbt i blodet kan istället denna parameter sannolikt användas som en indikator för endotoxinemi vid pyometra (Hagman et al., 2006).

## **Mastceller**

Mastceller härstammar från hematopoetiska progenitorceller lokaliserade i benmärgen. Mastcellerna mognar inte förrän de vandrar ut från blodbanorna in i bindväv eller mucosa (Bild 2). Stamcellsfaktor (SCF) agerar chemotaktiskt för mastcellerna till den vävnad där de behövs samt påverkar även proliferation och överlevnad av mastcellerna (Okayama et al., 2006).

Främst är mastcellerna förknippade med allergiska reaktioner där de genom sina preformerade mediatorer, förvarade i sekretoriska granula, ger upphov till en s.k. immunmedierad överkänslighetsreaktion (Kube et al., 1998). Dessa mediatorer innefattar bl.a. histamin, serotonin, cytokiner (bl.a. TNF) en del lysosomala enzymer samt proteaser. Man har på senare tid upptäckt att mastceller även har del i det medfödda försvaret mot vissa patogener. Mekanismerna bakom detta är dock inte helt klarlagda (Pejler et al., 2010).

Det finns tre olika sorters mastceller hos hund och dessa skiljer sig åt med avseende på sitt granulainnehåll. En av mastcellerna innehåller ett tryptas, medan den andra innehåller ett chymas och den tredje sorten innehåller både tryptas och chymas. Man kan, hos hund, inte se någon skillnad i fördelningen av mastceller i livmodervävnad på samma sätt som man har kunnat påvisa i andra organ (Kube et al., 1998).

*Bild 2. Bilden visar fyra mastceller (mörklila celler) lokaliserade i livmodervävnad hos en tik med pyometra. Vävnadssnittet är färgat med Toluidinblått.*

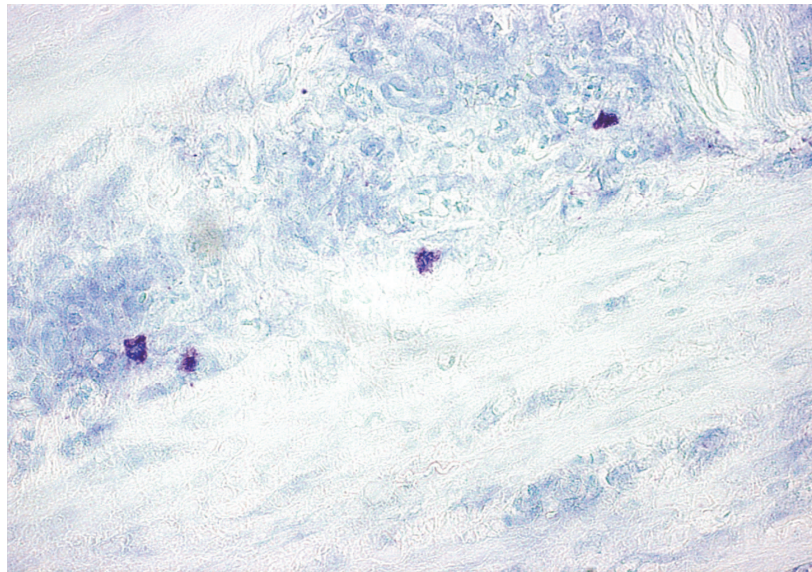


Foto: Camilla Axelsson

### **Proteaser**

Proteaser är enzymer som kan klyva målproteiner till mindre peptider och beroende på mekanismen som används vid klyvningen finns ett antal olika undergrupper av proteaser. Den största undergruppen är serinproteaser (Gallwitz, 1977). Det finns s.k. "mastcellsproteaser" och med det menas proteaser som specifikt uttrycks av mastceller. Dessa mastcellsproteaser är: chymaser (chymotrypsin-lik aktivitet, hydrolyserar peptidbindningar efter stora hydrofoba aminosyror), tryptaser (trypsin-lik aktivitet, hydrolyserar peptidbindningar efter positivt laddade aminosyror) och mastcells-CPA (carboxypeptidase A, hydrolyserar peptidbindningar från C-terminalen, dvs. den änden på proteinet som innehåller en carboxylgrupp, -COOH). Av dessa tre tillhör tryptaser och chymaser de s.k. serinproteaserna (Pejler et al., 2010). Även ett proteas med elastas-lik aktivitet (hydrolyserar peptidbindningar efter små aminosyror) tillhör de så kallade serinproteaserna men är inte ett mastcellsspecifikt enzym (Gallwitz, 1977). Elastas finns i granula hos neutrofiler och dess frisättning stimuleras av ett antal olika cytokiner och chemoattraktanter men även av lipopolysackarider (endotoxin) (Lee et al., 2001).

Tidigt hittades en chymotrypsin-lik aktivitet hos mastceller hos hund (Glenner et al., 1962), vilket senare kunde bevisas vara ett chymas (Caughey et al., 1990). Hos hund fann man även år 1987 ett trypsin-lik proteas som liknade mastcellstryptas (Caughey et al., 1987). Detta enzym kunde senare identifieras som just tryptas (Vanderslice et al., 1989). En signifikant ökad trypsin-lik aktivitet hos tikar med pyometra jämfört med friska tikar har också demonstrerats vilket tyder på att mastceller är involverade i sjukdomens patogenes (Wikström, 2008). Mastin är ett gelatinolytiskt peptidas med trypsin-lik aktivitet som utsöndras primärt från mastceller (Raymond et al., 2004). Genen för mastin har visats vara signifikant uppreglerad i livmodern hos tikar med pyometra jämfört med i livmödrar hos friska tikar (Hagman et al., 2009).

## **Syfte**

Syftet med denna studie var att studera förekomsten av enzymer utsöndrade av mastceller hos hundar med pyometra jämfört med friska tikar. Syftet var även att närmare undersöka om en ökad enzymaktivitet av flera proteaser kunde detekteras hos hundar med pyometra. Det slutgiltiga syftet med dessa studier var att undersöka om dessa enzymer möjligen skulle kunna användas som biomarkörer för tidig diagnos samt eventuellt prognos för hundar med pyometra.

## **METOD OCH MATERIAL**

Materialet som användes i denna studie, serumprover, histologisnitt och vävnader, insamlades under år 2007-2008 enligt tidigare beskrivning (Wikström, 2008) .

### **Etisk prövning**

Ansökan om etiskt tillstånd från Uppsala djurförsöksetiska nämnd var godkänd innan studien påbörjades. Djurägarna blev informerade om studien och fick ge sitt medgivande skriftligt till att deras hund ingick i försöket.

### **Djur**

De hundar som ingick i studien var samtliga patienter vid Universitetsdjursjukhuset (UDS) vid Sveriges Lantbruksuniversitet (SLU), Uppsala. I gruppen av tikar med pyometra ingick tikar som inkom till kliniken med sjukdom och som därefter diagnostiserades med livmoderinflammation och behandlades med ovariohysterektomi. Diagnosen pyometra verifierades sedan med hjälp av histopatologisk bedömning utförd vid enheten för patologi och viltsjukdomar, statens veterinärmedicinska anstalt (SVA), Uppsala. I kontrollgruppen ingick hundar som inkom till UDS för normalkastration (ovariohysterektomi) och utan tecken på klinisk sjukdom. Analyserade blodprover uppvisade heller inga avvikande parametrar från normalvariationen hos dessa kontrolltikar.

Antalet friska kontrolltikar i studien var sex stycken efter det att två av de initialt provtagna tikarna utesluts på grund av möjlig mastcellsdegranulering av annan orsak än livmoderinflammation. En av dessa tikar uteslöts från kontrollgruppen eftersom den var extremt stressad vid provtagningstillfället (Arck et al., 2006). Den andra tiken som uteslöts ur kontrollgruppen hade en betydande muskelinflammation vilket också kan leda till att mastceller degranulerar (Bortolotto et al., 2004).

Två av de initialt provtagna 17 hundarna i pyometragruppen fick uteslutas ur studien efter den histopatologiska undersökningen av livmödrarna. Detta resulterade i att det totalt var 15 stycken tikar som ingick i pyometragruppen, alla med pyometra enligt patologanatomisk diagnos.

### **Blodprovstagning**

I samband med operationstillfället togs blodprover i både serum och EDTA-rör (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österrike) vid placering av permanentkateter i distala v. *cephalica*. Proverna analyserades direkt med avseende på koncentrationen av gallsyror, alaninaminotransferas (ALAT), alkaliskt fosfatas

(ALP), kreatinin, urea, albumin, erythrocytvolymfraktion, hemoglobin, totalantalet leukocyter i partikelkoncentration (LPK) samt differentialräkning av stavkärniga och segmentkärniga granulocyter (inkluderande neutrofiler, basofiler och eosinofiler), monocyter och lymfocyter samt även eventuell förekomst av kärnförande erythrocyter. Samtliga dessa analyser utfördes på kliniskt kemiska laboratoriet, UDS, SLU.

## **Makroskopisk och histopatologisk undersökning**

Direkt efter operationen frystes 2-3 st. 1x1 cm-stora bitar av livmodervävnaden i flytande kväve och sparades sedan i -70°C frysfrys. Den resterande livmoder- och äggstocksvävnaden fixerades i formalin för senare makroskopisk samt histopatologisk undersökning som utfördes vid enheten för patologi och viltsjukdomar, SVA, Uppsala. Förändringarna i livmodervävnaden graderades även enligt en skala mellan 0-V där skalans indelning var som följer:

0 = inga patologiska förändringar

I = cystisk endometriehyperplasi (CEH)

II = CEH med endometrit

III = endometrit utan cystor

IV = pyometra (innefattande CEH)

V = atrofisk pyometra

Materialet till denna studie kommer från hundar i kontrollgruppen som fått bedömningen 0 på sin livmoder samt hundar i pyometragruppen som fått bedömningen IV på sin livmoder.

## **Western Blot**

Western Blot användes för att detektera och identifiera proteiner. Provet förbereds och appliceras sedan i gelbrunnar bredvid en känd proteinstege. Beroende på vikten av proteinerna i provet så vandrar de olika långt på gelen, små proteiner vandrar längst. Proteiner är negativt laddade och vandrar därför mot en positivt laddad pol. Sedan överförs banden från gelen till ett membran (se mer detaljerad information under stycket utförande). När man tillsätter primärantikroppar (primärAk) specifika för det protein man letar efter, fäster dessa till det aktuella proteinet. Sedan tillsätts sekundärantikroppar (sekundärAk) som är länkade till ett enzym som fluorescerar och som då fäster vid de tidigare fästa primärAk. Om proteinet finns i något av proverna så kommer först primärAk och sedan sekundärAk att fästa och ge upphov till fluorescens vid det provet på membranet. Fluorescensen kan sedan läsas av med hjälp av en Odyssey infrared imager under olika våglängder (700 eller 800 nm, beroende på vald sekundärAk) varvid banden på membranet kan ses. Då man vet molekylvikten på det sökta proteinet kan banden som fås på membranet jämföras med den kända proteinstegen för att se om banden som ses kan motsvara det sökta proteinet.

I detta försök kördes Western Blot på caspase 4 (molekylvikt: 45kDa), mastin (molekylvikt: 31 kDa) och tryptas (molekylvikt: 30,1 kDa) från serumprover samt på mastin från homogeniserad livmodervävnad. De primärAk som användes i



försöket var: Goat polyclonal to Caspase 4-(ab27485), Mouse polyclonal [AA1] to Mast Cell Tryptase –(ab2378), båda från Abcam (Cambridge, USA), samt Rabbit polyclonal to Mastin, framställda på lab (gåva av G. Caughey, UCSF, San Francisco, USA), genom att renat mastin injicerats i kaniner som sedan tappas på blod ett antal gånger, dvs. dessa antikroppar är ej kommersiellt tillgängliga.

### ***Homogenisering av vävnad***

Livmodervävnad från fyra friska kontrolltikar och fyra tikar med pyometra användes för Western Blot enligt följande protokoll för preparering av vävnaden: En liten bit livmodervävnad homogeniserades i 700 µl Low salt buffer som blandats med 0,5 tablett proteas inhibitor (för att undvika att proteaser i vävnaden bryter ner proteinet). Homogenaten centrifugerades i 13400 rpm i 4° C under 20 minuter. Supernatanten sparades. Pelleten löstes sedan upp i 400 µl High salt buffer och proverna sattes på skak i kylrum under 30 minuter. Sedan centrifugerades rören i 13400 rpm i 4°C under 20 minuter och supernatanten sparades även denna gång.

Med hjälp av BioRad Protein Assay mättes sedan koncentrationen protein i varje prov. Efter att ha spätt proverna till samma koncentration var de färdiga för att slutligen köra Western Blot.

### ***Utförande***

Western Blot på serumprov utfördes enligt följande för caspase 4 och tryptas: 20 µl serum (spädd med 40 µl destillerat vatten) blandades med 5 µl 5xSDS-buffert (spädd med 10 µl 5xSDS-buffert). Proverna centrifugerades och värmdes sedan 5 min i ett värmeblock (100°C) för att denaturera proteinerna så de kan vandra i gelen senare. Mixen centrifugerades igen och gelbrunnarna laddades, en av brunnarna laddades med proteinstege som storlekskontroll. Gelen inkuberades i 2 h, först 90 V sedan 110 V (nu vandrar proteinerna i gelen). Ett PVDF-FL-membran blöttes i Metanol. Två svampar och fyra filter blötlades i transferbuffert (för 2 l transferbuffert blandas: 4,84 g TRIS, 22,52 g Glycin, 400 ml Metanol, 1 ml 20 % SDS). Gelen placerades i följande ordning, med start från den vita sidan av behållaren: svamp- 2 filter- membran- gel- 2 filter- svamp . Transferboxen laddades och fylldes upp med transferbuffert och kördes i 100 mA under 1 h. Membranet plockades bort och lades i 5 ml Odyssey Blockingbuffer (spädd 1:1 med antingen PBS el TBS) under 1 timme (detta görs för att blockera ospecifika proteiner på pappret). Membranet tvättades i TBS med 0,1 % TWEEN20 under 3x5 min, sedan i TBS under 5 min. PrimärAk spädda 1:1000 tillsattes i totalt 5 ml Odyssey Blockingbuffer (från blockingsteget) till membranet och placerades i tät plastpåse på skakbord i kylrum under natten. Membranet tvättades i TBS med 0,1 % TWEEN20 under 3x10 min, sedan i TBS under 5 min. Efter detta tillsattes sekundär-antikaninAk, spädda 1:2000 i Odyssey Blockingbuffer. Membranet och sekundärAk placerades mörkt, då de ej får komma i kontakt med ljus, då de fluorescerar. Efter det placerades de på skakbord i 1-2 h, fortfarande mörkt. Membranet tvättades än en gång i TBS med 0,1 % TWEEN20 under 2x10 min, sedan i TBS under 10 min, fortfarande i svart låda. Membranet scannades sedan och beroende på vilken sekundärAk man har valt så väljer man antingen 700 eller 800 nm våglängd.

Western Blot på serum för mastin utfördes enligt följande: 5 µl serum blandades med 10 µl destillerat vatten och 5 µl 5xSDS-buffert. Försöket följde sedan schemat ovan som för caspase 4 och tryptas. PrimärAk späddes 1:1000 i totalt 5 ml Odyssey Blockingbuffer. 1 µl sekundär-antikaninAk späddes med 2 ml Odyssey Blockingbuffer (1:2000).

Western blot på de homogeniserade vävnadsproverna utfördes på samma sätt som beskrivet ovan med 25 µl prov av både High salt- och Low salt-lösningen till 7 µl 5xSDS-buffert. PrimärAk späddes 1:10 i totalt 1,5 ml Odyssey Blockingbuffer. Sekundär-antikaninAk späddes med Odyssey Blockingbuffer (1:2000).

### **Mätning av enzymaktiviteten**

För att kunna mäta aktiviteten av ett enzym i ett serumprov, i detta fall elastaslik, chymotrypsinlik och CPAaktivitet, kan man använda sig utav en metod med kromogena substrat. Ett kromogent substrat är en peptid som när ett proteas klyver det bildar färg. Denna färg kan sedan mätas i en spektrofotometer. Genom att följa förändringen av färg över tid kan man bestämma hur mycket aktivt proteas det finns i provet. S2288 är ett kromogent substrat som detekterar proteaser med trypsinlik aktivitet, dvs. proteaser som klyver efter positivt laddade aminosyror i proteinet. Genom att tillsätta specifika proteashämmare kan man utreda exakt vilka proteaser man har i provet. Om den specifika proteashämmaren är effektiv ser man ingen ökning av färg i provet eftersom det kromogena substratet då inte klyvs. Hämmning av tryptas utfördes i denna studie med MC 52355 (200 µM) vilket är en human tryptashämmare.

### **Utförande**

200 µl PBS-buffert blandades med 20 µl serumprov samt med 20 µl S2288 och tillsattes i en 96-hålsplatta. Mätning gjorde maskinen 1 gång/min under 1 h.

Tryptashämmare: 94 µl PBS-buffert blandades med 20 µl serumprov, 20 µl S2288 samt med 6 µl MC 52355 och tillsattes i en 96-hålsplatta. Mätning gjordes av maskinen 1 gång/min under 1 h.

Vi lät även proverna för elastaslik, chymotrypsinlik och CPAaktivitet gå över natten för att upptäcka eventuell ändring över en längre period.

### **Real time PCR**

Real time PCR är en metod som används för att detektera och kvantifiera specifika RNA-sekvenser och därigenom få rätt på hur högt uttrycket av den genen är. Genom att tillsätta cDNA tillsammans med rewerse- och forward-primrar specifika för den DNA-sekvens vi är intresserade av samt SYBR-Green-Supermix (BioRad, California, USA) så kan vi, om vi har DNA för vårt sökta protein, mäta en uppförökning av den sekvensen. cDNA har framställts från RNA preparerat från livmodervävnad från kontroller och pyometror. SYBR-Green-Supermixen består av ett fluorescerande ämne som fäster till dubbelsträngat DNA och innehåller även dNTPs, byggstenar för DNA-syntes samt ett polymeras.

Sekvenserna till de primrar som användes för real time PCR i denna studie redovisas i Tabell 1. Vid användning av nya primrar för första gången bör en

”primer efficiency test” (effektivitetstest) utföras för att se vilka av primrarna som fungerar bäst, dvs. är mest effektiv, och som man sedan väljer att använda i försöken.

*Tabell 1: Tabellen illustrerar sekvenser till de tre olika primers som användes för real time PCR i denna studie, här benämnda Mastin 1, 2 och 3.*

Mastingen	Sequence (5'→3')	Length	Start	Stop	Tm	GC%
Forward primer	CGTGCCCATAGCCCCGACC	20	45	64	59.83	70.00%
Reverse primer	CACTGGCCGCTACCCATGCC	20	173	154	60.11	70.00%
Product length	129 (Mastin 1)					
Forward primer	GGCATGGGTAGCGGCCAGTG	20	154	173	60.11	70.00%
Reverse primer	AGCTGCCCGACTTGGACCCT	20	287	268	59.82	65.00%
Product length	134 (Mastin 2)					
Forward primer	GCGTGGAGCTGGAGGGCTTG	20	233	252	60.04	70.00%
Reverse primer	TCCGCGCTGTCCCAGCCATA	20	380	361	60.32	65.00%
Product length	148 (Mastin 3)					

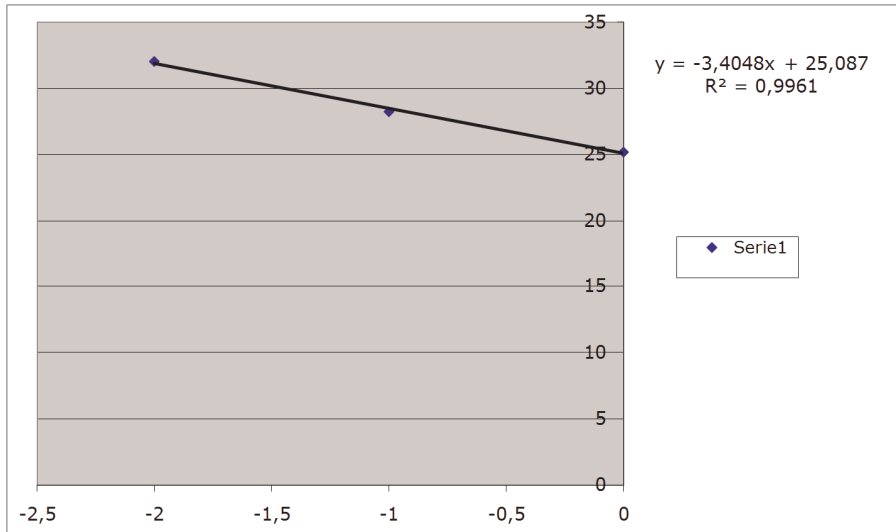
### **Primer efficiency (effektivitetstest)**

Effektivitetstest av de olika primers som var tänkta att användas i studien gjordes enligt följande: 5 µl reverse-primer samt 5 µl forward-primer blandades med 40 µl RNA i DNA-fritt vatten till en så kallad primermix. Sedan gjordes en mix av 5 µl SYBR-Green-Supremix, 0,2 µl primermix, 0,2 µl Referens dye (maskinen kan med hjälp av denna kontrollera korrekt pippetering) och 3,6 µl vatten. Därefter pipetterades 9 µl av denna mix samt 1 µl cDNA i plastbrunnar på plattan. Mätning av C<sub>T</sub>-värde gjordes för tre olika koncentrationer, 1:1, 1:10, 1:100 av mixen. Beroende på koncentrationen i provet från början tar det olika många cykler att uppnå C<sub>T</sub> för de tre proverna. Koncentrationerna på cDNA, dvs 1:1, 1:10 samt 1:100, logaritmerades (0, -1, -2) och plottades mot C<sub>T</sub>-värdena i en graf där man mätte lutningen på linjen. Lutningen, L, bör vara:  $-3,1 \geq L \geq -3,6$ . Se Figur 1.



Figur 1: Figuren nedan visar resultatet av primer efficiency test för mastin-primerpar 1.

Y-axel=  $C_T$ -värde.  $C_T$ -värdet kan förklaras som ett mått på mängden av den sökta sekvensen i provet. I början av analysen är mängden av den sökta sekvensen liten och det krävs fler fördubblingscykler för att få detekterbar mängd av provet. X-axel= log (koncentration cDNA). Formeln för y är raka linjens formel. -3,4 är lutningen på linjen vilken sedan används för att räkna ut effektiviteten av primern med hjälp av formeln:  $efficiency = 10^{(-1/slope)} - 1$ . Denna ska då vara nära 1 för att vara tillräckligt effektiv för försöket och i detta fall var resultatet 0,9961 ( $R^2 = 0,9961$ ).



Lutningen på linjen var i detta fall -3,4048 vilket är inom det rekommenderade intervallet och dessa primers kunde därmed anses vara tillräckligt effektiva för att användas i försöket.

## Utförande

För real time PCR (ABI PRISM 7900 HT) mixades 1  $\mu$ l cDNA med 9  $\mu$ l av vald primermix. Denna blandning tillsattes i plastbrunnar på en 384-hålsplatta bredvid en motsvarande Hprt-referensmix (9  $\mu$ l i varje brunn av följande mix: 200  $\mu$ l SYBR, 8  $\mu$ l primer 1, 8  $\mu$ l primer 2, 144  $\mu$ l  $H_2O$ ). Hprt är en gen som finns uttryckt i alla celler och Hprt-mix används som referenskontroll för att säkerställa att man tillsatt lika mängd cDNA i sina olika brunnar. Dessa kördes sedan i cykler enligt följande schema- 2 min i 50°C, 10 min i 95°C sedan (15 s i 95°C, 1 min i 60°C) x 40. Två blanka brunnar användes som negativa kontroller där man inte ska se någon uppförökning av DNA-sekvenser.

## Direktmikroskopi

Direktmikroskopering av livmodervävnad (12 snitt från tikar med pyometra samt tre snitt från friska kontrolltikar) utfördes för att undersöka om det vid pyometra blir en omfördelning eller uppförökning av mastceller i livmodervävnaden eller om man kan påvisa en ökad mastcellsdegranulering. Tidigare undersökningar har inte kunnat identifiera någon skillnad i fördelningen av mastceller mellan olika lager i livmodervävnaden hos hund på samma sätt som man sett i andra vävnader (Kube et al., 1998). De histologiska preparaten färgades innan mikroskoperingen med Toluidinblått för att underlätta mastcellsidentifieringen då Toluidinblått färgar in granula i mastcellerna med en mörklila färg. Totalantalet mastceller i

varje snitt beräknades, såväl som andelen degranulerade mastceller/snitt (cirka 50 celler räknades och andelen som var degranulerade av dessa beräknades sedan). Försöket utfördes blindat. Förstoring x200 (20x10) användes vid beräkning av totalantal mastceller/snitt. Förstoring x400 (40x10) användes vid att avgöra andelen degranulerade mastceller i förhållande till andelen intakta mastceller.

## Statistik

För att analysera resultaten i denna studie användes Graf pad prism's inbyggda statistikprogram som använder oparade t-tester (Student's t-test) (Graf pad software, California, USA). Nivån för signifikans sattes vid  $p < 0,05$ . Ett p-värde  $< 0,05$  innebar enstjärnig signifikansnivå,  $p < 0,01$  innebar tvåstjärnig signifikansnivå och  $p < 0,001$  innebar trestjärnig signifikansnivå.

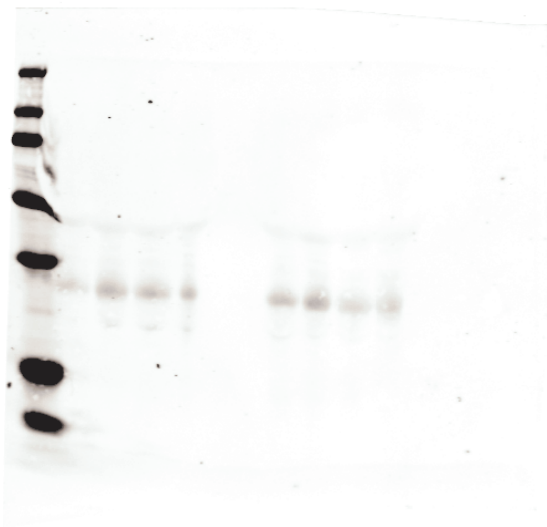
## RESULTAT

### Mastin

Mastin analyserades med avseende på förekomst i serum samt i homogeniserad livmodervävnad med hjälp av Western Blot. Även genuttrycket av mastin studerades med hjälp av real time PCR.

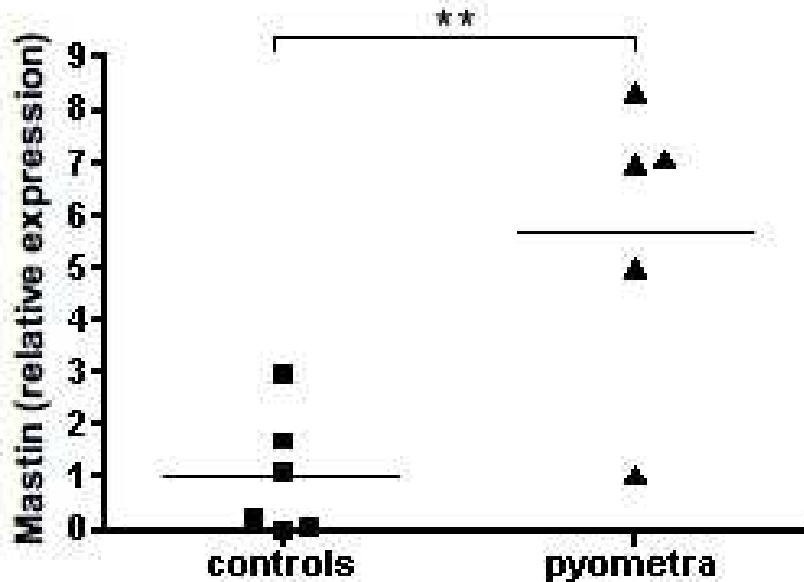
Resultaten av Western Blot visade inte på några specifika band som skulle kunna motsvara mastin varken i serum eller i vävnaderna. Bakgrundsband kunde ses för mastin när analysen gjordes på serum, men inga band alls kunde ses vid undersökning av livmodervävnad.

*Figur 2: Figuren visar resultatet av Western Blot utfört för mastin i serum. Proverna tagna från friska tikar motsvarar de fyra första banden på membranet räknat från vänster efter proteinstegen och prover från tikar med pyometra är de fyra banden längst till höger.*



Real time PCR visade högre uttryck av mastin i livmodervävnaden från tikar med pyometra med tvåstjärnig statistisk signifikans i jämförelse med kontrollgruppen (Student's t-test,  $p < 0,01$ ).

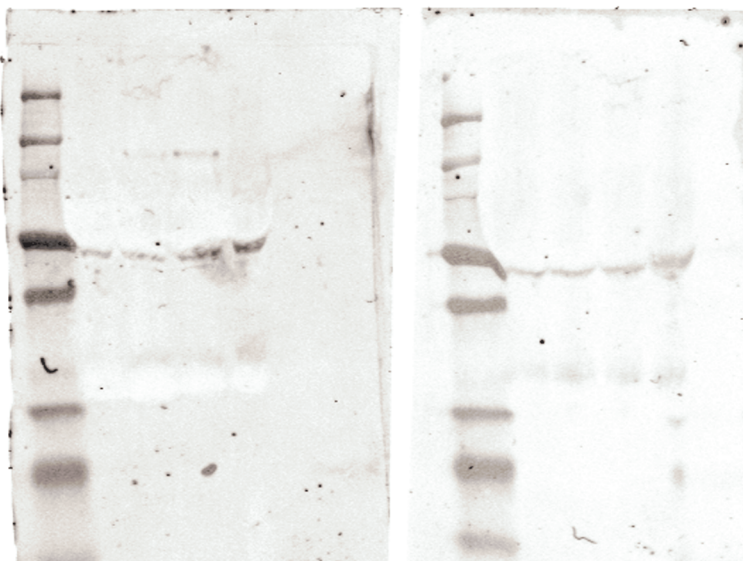
Figur 3: Figuren illustrerar uttrycket av mastin i livmodervävnad, visat med hjälp av real time PCR, hos tikar med pyometra (gruppen till höger) jämfört med friska kontrolltikar (gruppen till vänster). Resultatet visar en tvåstjärnig statistiskt signifikant skillnad (Student's t-test,  $p < 0,01$ ).



### Caspase 4 och tryptas

Caspase 4 och tryptas testades med Western Blot kört på serumprover. Inga specifika band som skulle kunna motsvara caspase 4 eller tryptas kunde ses i någon av hundgrupperna.

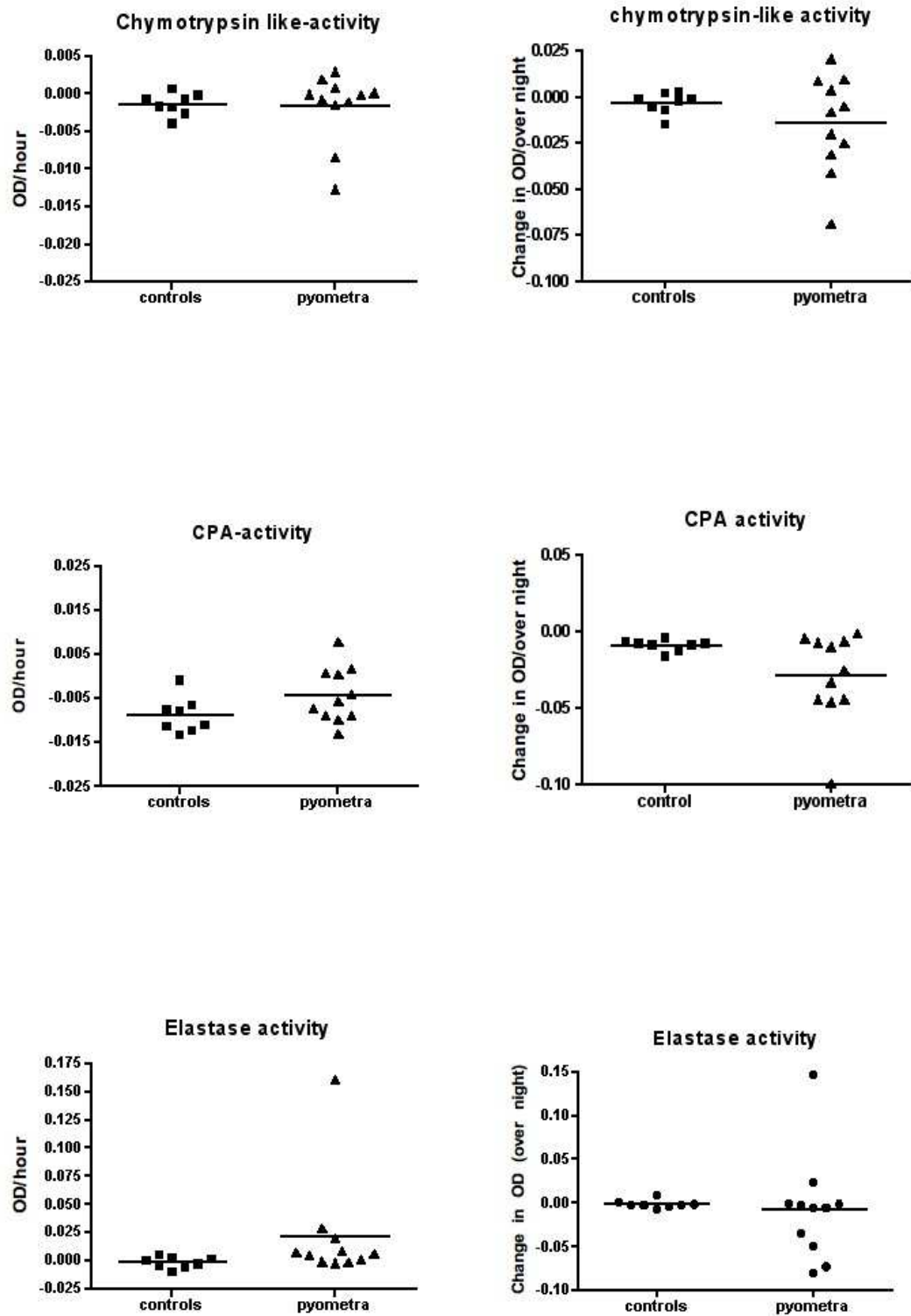
Figur 4: Figuren visar resultatet av Western Blot, på två membran, utfört för caspase 4 och tryptas i serum. Kontroller motsvarar de två första banden på varje membran räknat från vänster efter proteinsteget och tikar med pyometra är de två banden längst till höger på varje membran.



### **Elastas-lik, Chymotrypsin-lik samt CPA-aktiviet**

Försöket kunde inte påvisa någon skillnad av elastas-lik, chymotrypsin-lik eller CPA-aktivitet i serum hos hundar med pyometra jämfört med friska kontrolltikar.

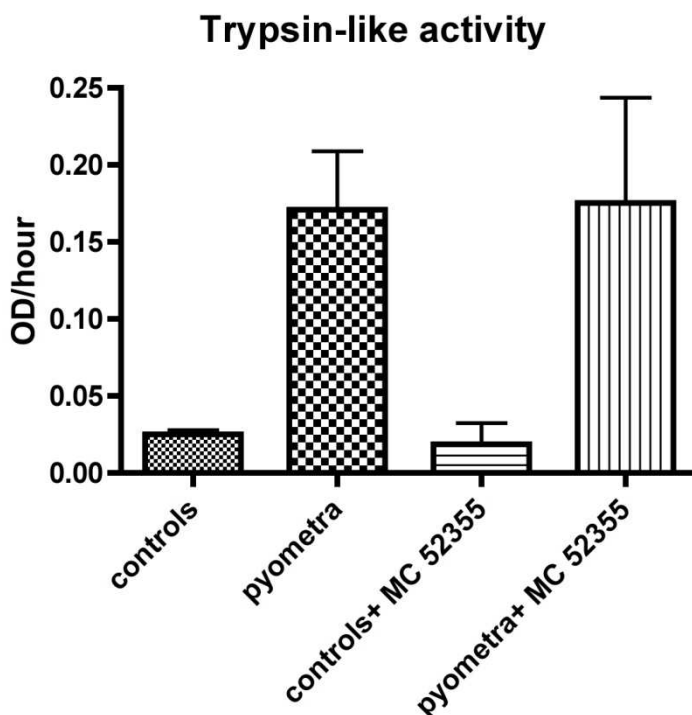
Figur 4: Figurerna nedan visar kromogenaktivitet (elastas-lik, chymotrypsin-lik eller CPA-aktivitet) i serum hos friska kontrolltikar jämfört med hundar med pyometra. Aktiviteten mättes 1 gång/min under 1 h (bilderna till vänster) samt efter 1 dygn (bilderna till höger). Friska kontrolltikar (controls) är gruppen till vänster i varje figur. Hundar med pyometra (pyometra) representerar gruppen till höger i varje figur.



## Trypsin-lik aktivitet

Hos tikarna med pyometra uppmättes signifikant högre trypsin-lik aktivitet i serum jämfört med de friska tikarna i kontrollgruppen (tvåstjärnig nivå av signifikans). Detta resultat är i överensstämmelse med tidigare utförda undersökningar av samma material och med samma metod (Wikström., 2008). Med den humana tryptashämmaren MC 52355 kunde däremot ingen skillnad i trypsin-lik enzymaktivitet uppmätas mellan de båda grupperna.

*Figur 5: De två första staplarna från vänster i figuren nedan visar kromogenaktivitet (trypsin-lik aktivitet) i serum hos friska kontrolltikar (första stapeln) jämfört med hundar med pyometra (andra stapeln). Aktiviteten mättes 1 gång/min under 1 h. De två staplarna längst till höger visar trypsin-lik aktivitet i serum hos friska kontrolltikar (tredje stapeln) jämfört med hundar med pyometra (fjärde stapeln) efter tillsats av den humana tryptashämmaren MC 52355.*

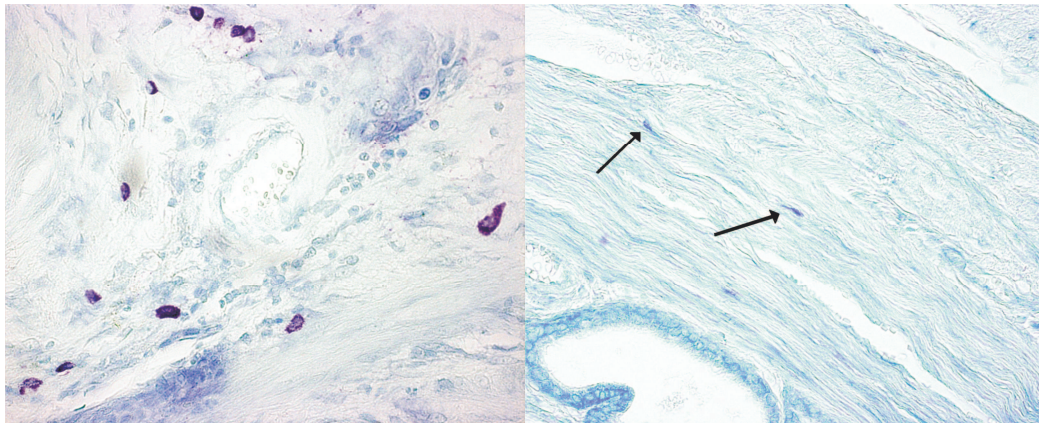


## Direktmikroskopi av histologipreparat

Någon större skillnad i totalantal mastceller/snitt mellan tikar med pyometra jämfört med friska tikar kunde inte påvisas. Däremot kunde en skillnad ses i antalet degranulerade mastceller, där nästan 40 % av mastcellerna hade degranulerat i livmodervävnaden från tikar med pyometra medan 20 % av mastcellerna hade degranulerat i livmodervävnaden från friska tikar (Figur 6). Mastcellerna sågs främst ligga i muskellagret (myometriet) i livmodern, både hos friska kontroller och snitt från livmodrar med pyometra. En stor andel mastceller sågs även vara placerade runt blodkärl (Bild 3).



*Bild 3. Bilden nedan till vänster visar 12 mastceller ansamlade runt ett kärl i livmodervävnaden hos en tik med pyometra. Bilden nedan till höger visar två mastceller (pilar) som ligger mellan myocyter i myometriet i livmodern hos en frisk tik.*



*Figur 6. Tabellen nedan illustrerar antalet mastceller, både i totalantal/snitt, samt antal degranulerade, i %, i livmodervävnaden från totalt 12 tikar med pyometra samt tre friska tikar.*

Snitt	Mastceller	
	Total mängd	% Degranulerade
Pyometra	318 (varav 61 % i myometriet)	39 %
Kontroller	184 (varav 66 % i myometriet)	21 %

## DISKUSSION

Vid tidigare undersökningar av livmodervävnad från hundar med pyometra har det visats att genen som kodar för mastin är kraftigt uppreglerad (Hagman et al., 2009). Dessutom ger sjukdomen pyometra en ökad trypsin-lik aktivitet i blodet hos drabbade tikar (Wikström., 2008). Denna studie utfördes för att undersöka om det kunde vara mastin, som har en trypsin-lik aktivitet, som ger upphov till den tidigare visade ökade trypsin-lik aktiviteten samt om detta enzym också gick att mäta i blodet. Resultaten av denna studie visar att när Western Blot kördes på serum uppnåddes inte mätbara nivåer av mastin. Vi kunde däremot med real time PCR-teknik se en tvåstjärnigt signifikant uppreglering av mastin-RNA i livmodern hos hundar med pyometra jämfört med friska tikar. Detta resultat stämmer väl med tidigare micro-arrayanalyser av hundar med sjukdomen (Hagman et al., 2009). För att utreda om mastin kanske bara finns lokalt i vävnaden och inte släpps ut i blodet utfördes ytterligare undersökningar där livmodervävnaden homogeniserades för att sedan användas för analys med

Western Blot. Resultatet av den senare Western Blot-analysen kunde dock inte påvisa några band som motsvarade mastin, varken i kontrollgruppen eller pyometragruppen. Om detta betyder att mastin finns på RNA-nivå men inte uttrycks som protein är fortfarande oklart och kräver fortsatt utredning. Mest troligt är det så att PCR-tekniken är mycket mer känslig än Western Blot eftersom den mäter vad som händer på gen-nivå. Det kan finnas mastinproteiner i vävnad och serum men i så små mängder att de ej är mätbara med Western Blot. Det kan också vara så att vi hade mindre bra primärantikroppar eller sekundärantikroppar när vi körde Western Blot eller att annat material eller vätskor som använts i försöket varit dåliga. Önskvärt för fortsatta studier vore att inkludera en positiv kontroll för mastin vid analyserna för att utesluta eventuellt falskt negativa resultat på grund av dåliga antikroppar eller vätskor. Bakgrundsbanden som kunde ses på Western Blotmembranet för mastin i serum beror troligtvis på ospecifika antikroppar i försöket, dvs. de binder in till andra proteiner än bara mastin.

Tryptas, ett serinproteas med trypsin-lik aktivitet, undersöktes i serum med hjälp av en human tryptashämmare, MC 52355. Syftet var att kunna säga om det var tryptas som låg bakom den tidigare visade trypsin-lik aktivitetsökningen (Wikström, 2008). Resultatet av denna undersökning visade dock ingen hämning med MC 52355 vilket skulle kunna betyda att det inte är tryptas som vi har i serumproverna från tikar med pyometra. Vi kan dock inte helt utesluta att det rör sig om tryptas eftersom hämmaren vi använt är ämnad för humant tryptas. Det är alltså inte säkert att denna hämmare faktiskt hämmar hundtryptas. Som det är i dagsläget finns det ingen specifik hundtryptas-hämmare tillgänglig för kommersiellt bruk. Då tryptas har en speciell form med många "active sites" vända inåt är det mycket svårt för specifika tryptashämmare att komma åt dessa och därmed hämma enzymaktiviteten (Pejler et al 2010). Detta skulle också kunna vara en förklaring till varför man inte får en hämning trots tillsats av MC 52355. Det skall även nämnas att den humana tryptashämmaren vi använde har stått i frysen under en längre tid vilket möjligen också kan ha påverkat aktiviteten negativt.

Vi studerade även aktiviteten av andra serinproteaser med hjälp av kromogena substrat, med anledning av den ökade trypsin-lik aktivitet man visat tidigare (Wikström, 2008). Vi såg med tvåstjärnig statistiskt signifikant skillnad en ökad trypsin-lik aktivitet vilket stämmer överens med tidigare resultat (Wikström, 2008). Vi kunde dock inte påvisa någon ökad CPA-aktivitet, elastas-lik aktivitet eller chymotrypsin-lik aktivitet varken efter en timme eller efter att försöket fick pågå med mätningar över natten. Dessa analyser kan således inte användas som markörer för pyometra.

Enligt en tidigare forskningsstudie där man påvisat en uppförökning av genen som kodar för mastin i livmodern vid pyometra såg man även en kraftig uppförökning av genen som kodar för caspase 4 (Hagman et al., 2009). Enligt resultaten från Western Blot utfört på serum i den här studien kunde vi dock inte se några band som motsvarar molekyylvikten för caspase 4. Även här kan man tänka sig att vi har för små mängder av själva proteinet för att det ska kunna mätas med den valda metoden. Alternativt är våra primär- eller sekundärantikroppar inte helt optimala. Att inkludera en positiv kontroll även för caspase 4 vore ett bra sätt att identifiera



eventuellt falskt negativa resultat i framtida studier. De bakgrundsband som kunde ses på Western Blotmembranen beror även här troligtvis på ospecifika antikroppar som binder in till andra proteiner än caspase 4. I fortsatta studier skulle man kunna tänka sig att analysera caspase 4 med real time PCR för att utvärdera om vi har ökat uttryck av caspase 4-RNA.

Vid direktmikroskopi av histologisnitt av livmödrar, specialfärgade med Toluidinblått, från tikar med pyometra och friska tikar kunde man inte se någon skillnad i totalantalet mastceller per snitt. Det var heller inte förväntat då antalet mastceller oftast är ”konstant” i en vävnad. Däremot kan man tänka sig att se en skillnad i antalet degranulerade mastceller som därmed skulle kunna vara ett tecken på en ökad aktivitet hos cellerna. Nästan 40 % av mastcellerna hade degranulerat i livmodervävnad från tikar med pyometra, medan drygt 20 % av mastcellerna hade degranulerat i livmodervävnad från friska tikar. Det här resultatet styrker tidigare resultat som tyder på att mastceller aktiveras och degranuleras då tikar drabbas av varbildande livmoderinflammation (Hagman et al., 2009, Wiskström, 2008). Att mastcellerna främst sågs i myometriet i livmodervävnaden, både hos friska och sjuka tikar, skulle kunna bero på att myocyter i livmoderns muskellager producerar SCF (stamcells faktor) (Mori et al., 1997), den faktor som agerar chemotaktiskt för mastceller till den vävnad där de behövs (Okayama et al., 2006). Många mastceller sågs även ligga runt blodkärl vilket inte heller är så konstigt då det är via blodet som mastceller tar sig ut i vävnaderna. Då endast tre snitt fanns från friska tikar och av dessa infärgades bara två snitt tillfredställande kan det vara önskvärt att i fortsatta studier ha fler snitt från friska tikar att jämföra med. Det ska även nämnas att flera av livmodersnitten från tikar med pyometra var mycket ljus infärgade och därmed blev något svårbedömda. Själva fixeringen av vävnaden kan även ha påverkat mastcellerna så att de såg degranulerade ut fast de inte var det.

Det är fortfarande intressant att ta reda på vad det är som gör att vi har en ökad trypsin-lik aktivitet i blodet hos tikar med pyometra. Idag finns dock inga tillgängliga hämmare för hundtryptas, vilket försvårar sådana fortsatta studier. Det finns flera icke mastcellsspecifika enzymer med trypsin-lik aktivitet, men det som ändå talar för att det är mastcellstryptas eller mastin som gett den ökade aktiviteten hos tikarna med pyometra är att man tidigare inte kunde se någon hämning vid användning av trypsininhibitor. Trypsininhibitor hämmar de flesta trypsin-lik serinproteaser men kommer inte åt att hämma just mastcellstryptas eller mastin (Wikström, 2008). Att genen för mastin blir uppreglerad vid pyometra är visat både i denna studie och i annan forskningsstudie (Hagman et al., 2009). Det är också visat att pyometra hos hundar ger mätbara nivåer av histamin i blodet (Wikström, 2008). Vi kan alltså dra slutsatsen att mastceller aktiveras vid pyometra och frisläpper mastin samt histamin. En tänkbar fortsättning skulle kunna vara att analysera tryptas med hjälp av real time PCR. Men samtidigt sågs inte genen för tryptas vara uppreglerad i gene-array studien (Hagman et al., 2009), så som genen för mastin sågs vara, vilket var anledningen till att vi i denna studie valde att analysera just mastin med real time PCR.

Vi skulle i fortsatta studier vilja undersöka om dessa enzymer uppregleras enbart vid pyometra eller om det sker generellt vid utveckling av sepsis. Om det är så att

de uppregleras generellt vid sepsis kan analys av dessa parametrar eventuellt användas för att tidigt diagnostisera begynnande sepsis och därmed förbättra prognosen för tillfrisknande.

## **TACK**

Det finns många jag skulle vilja tacka för all hjälp jag fått. Först och främst vill jag tacka Ragnvi Hagman, min huvudhandledare, för all hjälp med artikelsökning, upplägg och skrivande av arbetet samt alla glada tillrop under arbetets gång. Sen vill jag tacka mina två biträdande handledare, Elin Rönnberg och Gunnar Pejler, för all hjälp med laborationsarbete och idéer på nya labbar att utföra. Jag vill även tacka Helena Wensman och Anders Lundequist för hjälp med bland annat färgning av histologisnitt samt tips och råd inför direktmikroskopi av preparaten. Sist, men inte minst, vill jag tacka Erika Karlstam på SVA, för hjälp med histopatologin av livmödrarna, samt G. Caughey, UCST, San Fransisco, USA, för de mastinAk som vi använde i försöket.

## REFERENSER

- Arck P.C., Slominski A., Theoharides T.C., Peters E. M. J., Paus R., 2006. Neuroimmunology of Stress: Skin Takes Center Stage. *J Invest Dermatol*, 126(8): 1697-1704
- Bortolotto S. K., Morrison W. A., Messina A., 2004. The role of mast cells and fibre type in ischaemia reperfusion injury of murine skeletal muscles. *J Inflamm (Lond)*, 1:2
- Bowen R.A., Olson P.N., Behrendt M.D., Wheeler S.L., Husted P.W & Nett T.M. 1985. Efficacy and toxicity of estrogens commonly used to terminate canine pregnancy. *Journal of the american veterinary medical association* 186:783-788
- Caughey G.H., Raymond W.W Vanderslice P., 1990. Dog Mast Cell Chymase: Molecular Cloning and Characterization. *Biochemistry* 29, 5166-5171
- Caughey G.H., Viro N.F., Ramachandran J., Lazarus S.C., Borson D.B., Nadel J.A., 1987. Dog mastocytoma rtyptase: affinity purification, characterization, and amino-terminal sequence. *Arch. Biochem. Biophys.* 258(2):555-63
- De Bosschere H., Ducatelle R., Vermeirsch H., Van Den Broeck W., Coryn M., 2000. Cystic endometrial hyperplasia-pyometra complex in the bitch: should the two entities be disconnected? *Theriogenology* 55:1509-1519
- De Bosschere H., Ducatelle R., Vermeirsch H., Simoens P., Coryn M., 2002. Estrogen- $\alpha$  and progesterone receptor expression in cystic endometrial hyperplasia and pyometra in the bitch. *Animal reproduction science* 70 (2002)251-259
- Dow C, 1959. Experimental reproduction of the cystic hyperplasia-pyometra complex in the bitch. *The journal of pathology and bacteriology* 78:267-278
- Egenvall A., Hagman R., Bonnett B. N., Hedhammar Å., Olson P., Lagerstedt A-S., 2001. Breed Risk of Pyometra in Insured Dogs in Sweden. *Journal of veterinary internal medicine* 2001;15:530-538
- Gallwitz M, 1977. *Sculpted trough Time: Evolution and Function of Serine Proteases from the Mast Cell Chymase Locus*. Uppsala Universitet. 91-554-6748-2
- Glenner G.G., Hopsu V.K., Cohen L.A., 1962. Histochemical demonstration of a trypsin-like esterase activity in mast cells. *Histochem. Cytochem.* 10, 109
- Hagman R., Kindahl H., Lagerstedt A-S., 2006. Pyometra in bitches induces elevated plasma endotoxin and prostaglandin F<sub>2α</sub>-metabolite levels. *Acta vet. scand.* 2006, 47, 55-68
- Hagman R., Rönnerberg E., Pejler G., 2009. Canine Uterine Bacterial Infection Induces Upregulation of Proteolysis-Related Genes and Downregulation of Homeobox and Zinc Finger Factors. *Plos ONE* 4(11): e8039. Doi:10.1371/journal.pone.0008039
- Hardy RM., Osborne CA., 1974. Canine pyometra: pathophysiology, diagnosis and treatment of uterine and extra-uterine lesions. *J Am Anim Hosp Assoc.* 1974;10:245–267
- Johnson C., (2003) Reproductive system disorders. In: Nelson R. W., Couto C. G. *Small animal internal medicine*. Upplaga 3. 877-880. St. Louise, Missouri.
- Kube P., Audigé L., Küther K., Welle M., 1998. Distribution, density and heterogeneity of canine mast cells and influence of fixation techniques. *Histochem Cell Biol* 110:129-135
- Lee W.L., Downey G.P., 2001. Leukocyte Elastase, Physiological Function and Role in Acute Lung Injury. *Am J Respir Crit Care Med.* Vol 164. pp 896-904

- Martinon F., Tschopp J. , 2006. Inflammatory caspases and inflammasomes: master switches of inflammation. *Cell death and Differentiation*. 14, 10-22
- Mori A., Nakayama K., Suzuki J., Nikaido T., Isobe M., Fujii S., 1997. Analysis of stem cell factor for mast cell proliferation in the human myometrium. *Molecular Human Reproduction*, Vol 3, no 5, pp. 411-418
- Okano S., Tagawa M., Hara Y., Ejima H., Motoyoshi S., Urakawa N., Furukawa K., Onda M., Ogawa R., 1993. Changes in reticuloendothelial Function in Dogs with Endotoxin-Induced Shock. *Journal of veterinary medical science* 55(4):607-11
- Okano S., Tagawa M., Takase K., 1998. Relationship of the blood endotoxin concentration and prognosis in dogs with pyometra. *Journal of veterinary medical science* 60, 1265-1267
- Okayama Y., Kawakami T., 2006. Development, Migration and Survival of Mast Cells. *Immunol Res*. 2006; 34(2): 97-115
- Pejler G., Rönnberg E., Waem I., Wernersson S., 2010. Mast cell proteases: multifaceted regulators of inflammatory disease. *BLOOD*, Vol 115, Nr 24
- Raymond W W., Sommerhoff C P., Caughey G H., 2004. Mastin is a gelatinolytic mast cell peptidase resembling a mini-proteasome. *Arch Biochem Biophys* 435(2):311-22
- Sandholm M., Vasenius H., Kivistö A-K., 1975. Pathogenesis of Canine Pyometra. *JAVMA*, vol 167, No. 11
- Shenap J. L., Mogan K. A., 1984. Kinetics of Endotoxin Release During Antibiotic Therapy For Experimental Gram-Negative Bacterial Sepsis. *The journal of infectious diseases* Vol. 150, No 3
- Vandeplassche M., Coryn M., De Schepper J., 1991. Pyometra in the bitch: cytological, bacterial, histological and endocrinological characteristics. *Vlaams Diergeneesk Tijdschr*, 1991, 60, 207-211
- Vanderslice P., Craik C.S., Nadel J.A., Caughey G.H., 1989. Molecular Cloning of Dog Mast Cell Tryptase and a Related Protease: Structural Evidence of a Unique Mode of Serine Protease Activation. *Biochemistry* 28, 4148-4155
- Wikström S., 2008. *Mastcellsfunktionen vid pyometra hos hund*. Uppsala: Sveriges Lantbruksuniversitet.